بررسی مولکولی شیوع و شناسایی اشریشیاکلای انتروهموراژیک جداسازی شده از یک نوع پنیر سنتی ایرانی

مریم ملکی پروری [۱](M.Sc)، مهنوش پارسایی‌مهر [۱*](Ph.D)، حمید استاجی [۲](Ph.D)، اشکان جبلی جوان [۱](Ph.D)

۱- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دام‌پزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دام‌پزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۱۵۳۲۶۲۶ mparsaei@semnan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۴

چکیده

هدف: سویه‌های اشریشیاکلای مولد شیگاتوکسین، یکی از عوامل اصلی ایجادکننده مسمومیت غذایی و بیماری‌هایی مانند کولیت خونریزی‌دهنده و سندرم اورمی همولیتیک هستند. عفونت‌های غذایی عمدتاً از طریق مصرف مواد غذایی با منشاء حیوانی مانند گوشت و فرآورده‌های لبنی منتقل می‌شوند. بنابراین، هدف این مطالعه، بررسی ژن‌های حدت در باکتری اشریشیاکلای جدا شده از نمونه‌های پنیر سنتی شهر سمنان به روش Multiplex PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. جدایه‌های اشریشیاکلای توسط روش‌های استاندارد میکروبیولوژی و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی شدند. جدایه‌های اشریشیاکلای از نظر وجود ژن‌های stx1، stx2، eaeA و ehlyA توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: از نمونه‌های پنیر مورد بررسی، تعداد ۵۹ سویه اشریشیاکلای جداسازی شدند. که از این تعداد ۵۵ جدایه دارای ژن‌های حدت بودند (۹۳/۲٪) و از این میان ۴۴ جدایه، حامل بیش از یک ژن حدت و ۱۱ جدایه، تنها حامل یک ژن حدت بودند. Stx2 بیش‌ترین ژن حدت شناسایی شده در میان جدایه‌ها تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع اشریشیاکلای‌های حاوی ژن‌های حدت در جدایه‌های اشریشیاکلای بیماری‌زا در پنیرهای سنتی، به کارگیری روش‌های مولکولی به منظور بررسی کنترل کیفیت میکروبی این محصولات ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلای مولد شیگاتوکسین، فاکتور حدت، پنیر، Multiplex PCR

مقدمه

پنیر یکی از فرآورده های مهم لبنی و دارای تاریخ چه طولانی در تأمین مواد مغذی ضروری برای انسان می‌با شد که برحسب انواع آن حاوی مقادیر مختلف پروتئین، چربی، آب و املاح است. علی‌رغم رشد صنایع لبنیات و توسعه کارخانجات پنیرسازی بسیاری از تولیدکنندگان در سراسر دنیا علاقه دارند روش‌های تولید سنتی خود را حفظ نمایند [۱]. در ایران انواع مختلفی از پنیرها به طریق سنتی تولید می‌شوند، پنیر سنتی خیکی یکی از انواع پنیرهای سنتی رسیده ایران می‌باشد که در استان سمنان و در مناطق ییلاقی این استان تولید می‌شود. پنیر خیکی مانند اکثر پنیرهای سنتی موجود در دنیا بدون افزودن هیچ‌گونه آغازگر و برحسب تجربه دیرینه دامداران عموماً از شیر خام گوسفند و بز تهیه و علی‌رغم برتری‌های حسی نسبت به پنیرهای صنعتی با توجه به تهیه این پنیر از شیر خام و آلوده شدن شیر در مراحل تولید و پس از دوشش به صورت آلودگی ثانویه و نحوه آماده‌سازی و رساندن پنیر احتمال خطرات بهداشتی و آلودگی پنیرهای تولید شده به انواع باکتری‌های فاسدکننده و بیماری‌زا از جمله اشریشیاکلای وجود دارد [۳،۲].

باکتری اشریشیاکلای جزو فلور طبیعی روده تمام حیوانات خون‌گرم می‌با شد. ح ضور این باکتری در آب و غذا به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی بیماری‌زاهای غالب پذیرفته شده است [۴]. چندین سویه از باکتری اشریشیاکلای به عنوان بیماری‌زاهای بالقوه در غذا معرفی شده‌اند. اشریشیاکلای انتروهموراژیک (EHEC) یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خطرناک که حتی می‌تواند باعث مرگ و میر بالا هنگام اپیدمی‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده گردد، معرفی شده است. این باکتری باعث ایجاد اسهال و کولیت خونریزی‌دهنده در انسان می‌شود. کولیت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]

خونریزی‌دهنده گاهی به سندرم همولیتیک کلیوی منجر می شود که یک علت مهم نارسایی حاد کلیه در بچه‌ها و مرگ و میر در بزرگسالان می‌باشد [۵]. حداقل ۱۰۰ سروتایپ E.coli قادر به تولید شیگاتوکسین می‌باشند [۶]. برخی مطالعات نشان می‌دهند که گوسفند و بز منابع مهم اشریشیاکلای تولیدکننده شیگاتوکسین هستند. آلودگی شیر به مدفوع این حیوانات و استفاده از این منابع در تهیه فرآورده‌های لبنی می‌تواند منبع بالقوه باکتری برای انسان باشد [۷]. مطالعات نشان می‌دهند که در اکثر موارد، بیماری‌زایی باکتری اشریشیاکلای با حضور ژن‌های حدت این باکتری همراه می‌باشد. از مهم‌ترین ژن‌های حدت باکتری اشریشیاکلای تولیدکننده شیگا توکسین می‌توان به شیگا توکسین ۱ (stx1)، شیگا توکسین ۲ (stx2)، پروتیین اینتیمین (eae) و پلاسمید کدکننده انتروهمولیزین (ehlyA) اشاره نمود [۸]. شیوع غذایی سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلای ناشی از مصرف فرآورده‌های حیوانی و گیاهی حرارت ندیده و غیر پاستوریزه، به‌ویژه شیر و پنیرهای حرارت ندیده، گوشت چرخ‌شده و سایر انواع گوشت‌ها، سبزیجات به‌ویژه کاهو و میوه‌جات می‌باشد [۱۰،۹]. به دلیل بیماری‌زایی و دوز عفونی اندک برخی سویه‌ها به‌ویژه اشریشیاکلای بیماری‌زای، سازمان بهداشت جهانی، تأکید زیادی را بر پایش مستمر سویه‌های E.coli مولد شیگاتوکسین دارد. با توجه به عدم وجود اطلاعات دقیق در خصوص ارزیابی ژن‌های بیماری‌زای این باکتری در پنیر سنتی سمنان و از آن‌جایی‌که این پنیر به طور وسیعی در استان سمنان مصرف می شود و شیوع سویه‌های بیماری‌زای E.coli مولد شیگاتوکسین در جامعه، سلامت و بهداشت عمومی را به مخاطره می‌اندازد، لذا این تحقیق، با هدف مطالعه میزان شیوع سویه‌های اشریشیاکلای بیماری‌زا و تعیین حضور برخی ژن‌های حدت سویه‌های جدا شده از پنیر سنتی سمنان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی- تحلیلی به منظور بررسی میزان شیوع ژن‌های حدت stx1، stx2، eaeA و ehlyA در سویه‌های اشریشیاکلای‌های جدا شده از پنیرهای سنتی مناطق ییلاقی شمال استان سمنان با استفاده از روش Multiplex PCR انجام شد.

نمونه‌گیری

تعداد ۱۰۰ نمونه پنیر به وزن ۱۰۰ گرم از پنج سرداب در مناطق ییلاقی مختلف در شمال سمنان (عمدتاً مناطق ییلاقی مهدیشهر و شهمیرزاد) در مدت زمان یک سال و در هر فصل ۵ نمونه از هر سرداب به صورت نمونه‌برداری تصادفی مستقیماً از خیک‌های محتوی آن، جمع‌آوری و با استفاده از دستکش‌های استریل و رعایت اصول بهداشتی به ظرف‌های درپوش‌داری که قبلاً استریل شده انتقال یافت. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان منتقل و در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری و در کمتر از ۲۴ ساعت، آزمایشات مورد نظر بر روی آن‌ها انجام شد. برای جست‌وجو و شناسایی کلیفرم و اشریشیاکلای بیماری‌زا از استانداردهای ملی به شمارش ۹۴۱۵ و ۵۴۸۶ و ۵۲۳۴ استفاده گردید. در ابتدا تمامی نمونه‌های پنیر وارد محیط لاکتوز براث شده سپس برای جداسازی کلیفرم وارد محیط Violet Red Bile (VRBA) Agar شدند. برای تایید تشخیص کلیفرم نمونه‌ها به محیط Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGBLB) انتقال داده شدند، که با مشاهده گاز درون لوله درهام ناشی از تخمیر لاکتوز، وجود کلیفرم تایید شده سپس برای تمایز اشریشیاکلای از سایر کلیفرم‌ها نمونه‌ها وارد محیط Eosin Methylene Blue (EMB) شدند، پرگنه‌هایی با جلای فلزی به محیط Brain Heart Infusion Agar (BHIA) منتقل و کشت داده شدند و تست‌های تاییدی از جمله آزمون IMVIC، کاتالاز و اکسیداز بر روی آن‌ها صورت پذیرفت.

استخراج DNA از جدایه‌ها

برای استخراج DNA از روش لیز سلولی با استفاده از سود نیم نرمال با روش ROSE استفاده گردید [۱۲،۱۱]. بدین صورت که، ۲۵ میکرولیتر NaOH نیم نرمال به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شده سپس با یک آنس استریل از محیط کشت MAC آگار کلنی برداشت کرده و درون NaOH نیم نرمال مخلوط تا شیرابه‌ای تهیه گردد. سپس ۳۰ دقیقه به محلول فرصت داده شد تا عمل هضم باکتری توسط NaOH صورت گیرد. ۲۵ میکرولیتر تریس یک مولار به محلول فوق اضافه گردید تا فرآیند هضم متوقف گردد و محلولی با PH نهایی ۷/۵ تهیه شود. بلافاصله با افزودن ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حجم محلول را به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده و رقت نهایی از عصاره DNA برای آزمایش PCR آماده گشت.

آزمون Multiplex PCR جهت ردیابی ژن های stx1، stx2، eaeA و ehlyA

پس از انجام مراحل استخراج DNA از سوش های اشریشیاکلای مورد مطالعه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه مطابق پروتکل ارائه شده توسط استاجی و همکاران (۲۰۱۷) و با استفاده از چهار جفت پرایمر اختصاصی ژن‌های Stx1،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]

Stx2، eaeA و ehlyA، درون دستگاه ترموسایکلر (BIOER-CHINA) انجام گرفت [۱۳].

روش انجام آزمون PCR جهت رد یابی ژن های stx1، stx2، eaeA و ehlyA:

برای انجام این آزمایش از روش Multiplex PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد و از سویه استاندارد اشریشیاکلای ATCC 35218 به عنوان کنترل مثبت ژن‌های Stx1، Stx2، eaeA و ehlyA استفاده گردید.

جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژن‌های حدت باکتری اشرشیاکلی در نمونه‌های پنیر محلی [۱۴].

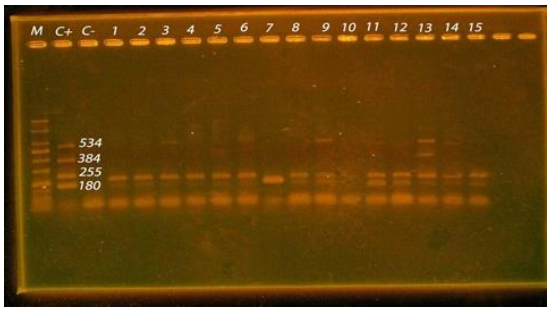
اندازه محصول b (p)	سکانس الگوی نوکلئوتیدی (۳→۵)	پرایمر	منابع
۱۸۰	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	stx1F	Paton و Paton، (۱۹۹۸)
	AGAACGCCCACTGAGATCATC	stx1R	
۲۵۵	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	stx2F	Paton و Paton، (۱۹۹۸)
	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	stx2R	
۳۸۴	GACCCGGCACAAGCATAAGC	eaeAF	Paton و Paton، (۱۹۹۸)
	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	eaeAR	
۵۳۴	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	hlyAF	Paton و Paton، (۱۹۹۸)
	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	hlyAR	

پس از انجام مراحل استخراج DNA از پرگنه‌های مورد مطالعه، واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر و در دستگاه PCR Thermal Cycler (Bioer xp, China) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با مرحله واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۸/۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد [۱۳]. برای قرائت نتایج PCR چندگانه، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. در گوده اول ژل نیز مارکر bp-plus100 استفاده شد (شکل ۱). برای رنگ‌آمیزی ژل از رنگ Ethidium Bromide استفاده شده و زیر دستگاه UV illuminator (Nanolytik, UK) نتایج بررسی شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌های اشریشیاکلای

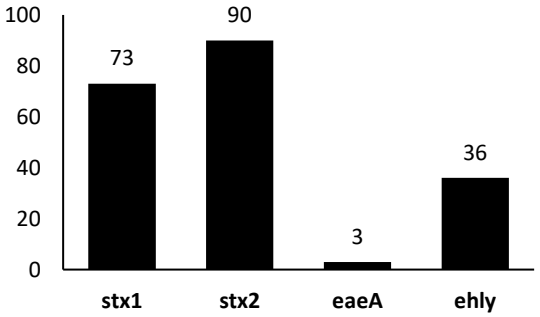
تعداد ۵۹ جدایه باکتری اشریشیاکلای از ۱۰۰ نمونه پنیر خیکی، بر اساس استانداردهای ملی، ویژگی‌های کشت و بیوشیمیایی این باکتری، شناسایی و تایید شدند (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج کشت در محیط VRBA (A)، محیط BGBLB (B) و محیط EMB (C) جهت شناسایی جدایه‌های اشریشیاکلای

نتیجه آزمایش MULTIPLEX PCR جهت بررسی ژن‌های حدت در جدایه‌ها

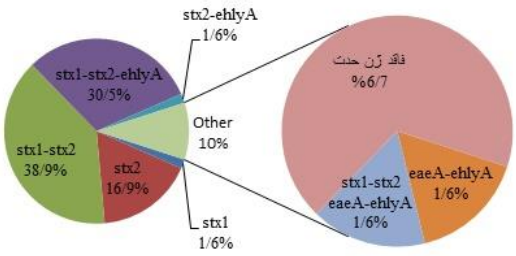
نتایج آزمایشات PCR جهت تعیین ژن های حدت جدایه‌ها، نشان داد که از ۵۹ جدایه بررسی شده، ۴۳ جدایه حامل ژن stx1، ۵۳ جدایه stx2، ۲ جدایه eaeA و ۲۱ جدایه نیز حامل ژن ehlyA شناسایی شدند. نتایج در شکل ۱ شرح داده شده است.



شکل ۲. درصد فراوانی هر کدام از ژن‌های حدت در کل جدایه‌ها

با توجه به انجام آزمون Multiplex PCR ترکیب ژن‌های حدت موجود در هر جدایه مشخص شد. از میان ۵۹ جدایه، ۴۴ جدایه (۷۴/۵٪ جدایه‌ها)، حامل بیش از یک ژن حدت بودند. و ۱۱ جدایه (۱۸/۶٪ جدایه‌ها)، تنها حامل یک ژن حدت بودند و ۴ جدایه (۶/۷٪ جدایه ها) هم هیچ یک از ژن‌های حدت مورد بررسی را نشان نداند. تعداد و درصد کلی ژن‌ها در شکل۳ نشان داده شده است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]



شکل ۳. درصد فراوانی ژن-های حدت به صورت تکی و ترکیبی- در جدایه ها

بحث و نتیجه‌گیری

اشریشیاکلای به عنوان شایع‌ترین و مهم‌ترین جنس در خانواده انتروباکتریاسه که بخشی از فلور طبیعی روده در انسان و حیوانات خون‌گرم نیز می‌باشد، با داشتن ژن‌های حدت، نقش مهمی را در ایجاد بیماری در انسان و حیوان ایفا می‌کند. این بیماری‌زاها به طور کلی عامل بروز سه نوع عفونت بالینی در انسان، اسهال و بیماری‌های روده‌ای، عفونت‌های مجاری ادراری و سپتی سمی و منژیت محسوب می‌شوند [۱۵]. علاوه بر آن اشریشیاکلای به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی در مواد غذایی مطرح می‌باشد. چندین سویه از باکتری اشریشیاکلای به عنوان بیماری‌زاهای بالقوه در غذا معرفی شده‌اند [۴]. این بیماری‌زاها عمدتاً از مواد غذایی مانند گوشت و فرآورده‌های گوشتی خام و شیر و فرآورده‌های غیر پاستوریزه آن منتقل می شوند [۱۶]. در سال‌های گذشته تحقیقات گسترده‌ای در مناطق مختلف دنیا بر روی پنیرهای سنتی به منظور بررسی آلودگی به کلیفرم و اشریشیاکلای از طریق روش‌های مختلف از جمله روش کشت انجام شده است. نتایج مطالعات نشان داد که، در بیش‌تر موارد پنیرهای سنتی به دلیل غیر پاستوریزه بودن و دارا بودن اکثر عناصر و ترکیبات غذائی که برای رشد میکروارگانیسم لازم بوده و همچنین قابلیت فساد‌پذیری بالا، از استانداردهای بهداشتی فاصله دارند و مشاهده آلودگی فرآورده‌های لبنی از جمله پنیر به اشریشیاکلی در بیش‌تر موارد وجود دارد [۱۷].

در مطالعه‌ای که توسط وزیری و نوروزی در سال ۱۳۹۰ به منظور بررسی آلودگی پنیر سنتی تبریز به کلیفرم و اشریشیاکلای انجام شد مشخص شد که ۹۸٪ نمونه‌ها به کلیفرم و ۵۰٪ به اشریشیاکلای آلوده بودند [۱۸].

در مطالعه دیگری که بر روی پنیر سنتی زاهدان صورت گرفت ۱۲۰ نمونه آزمایش شدند که ۹۴/۲٪ نمونه‌ها به کلیفرم و ۵۲٪ نمونه ها به اشریشیاکلای آلوده بودند [۱۹]. در بررسی‌ای که توسط رضائی و همکارن در سال ۱۳۹۳ بر روی پنیر سنتی استان مرکزی انجام شد، ۳۴٪ نمونه‌ها آلوده به اشریشیاکلای بودند [۱۶].

در مطالعه‌ای که پارسایی‌مهر و همکاران در سال ۱۳۹۴ بر روی کیفیت میکروبی پنیر سنتی سمنان انجام دادند کلیفرم‌ها و باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه تقریباً از تمام نمونه‌های پنیر به طور متوسط به میزان ۵/۸۴ و ۵/۹۷ Log CFU/g جدا گردید [۲۰].

در این تحقیق، یکی از اهداف بررسی میزان آلودگی پنیر سنتی سمنان به کلیفرم و اشریشیاکلای بود که جدا سازی و شناسایی باکتری اشریشیاکلای در پنیر سنتی (خیکی) سمنان با استفاده از روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. طبق نتایج به دست آمده از مجموع ۱۰۰ نمونه مورد آزمایش ۷۲ نمونه (۷۲٪) آلوده به کلیفرم و ۵۹ نمونه (۵۹٪) آلوده به اشریشیاکلای بودند.

بالا بودن تعداد کلیفرم را می‌توان به آلودگی شیر مصرفی جهت تهیه پنیر نسبت داد. زیرا با توجه به این‌که کلیفرم‌ها شامل باکتری‌هایی هستند که محل طبیعی زندگی آن‌ها در روده و مکان‌هایی غیر از روده همانند آب و خاک می‌باشد و از سویی با در نظر گرفتن این امر که شیر در هنگام خروج از پستان دام سالم حاوی تعداد نسبتاً کمی باکتری می‌باشد و معمولاً نیز این باکتری‌ها در تحت شرایط عادی جابه‌جایی در شیر رشد نمی‌کنند، بنابراین آلودگی محل‌های نگه‌داری دام و همین‌طور استفاده از آب‌های آلوده و شرایط دوشیدن و ظروف نگه‌داری شیر می‌تواند سبب آلودگی شیر شده و استفاده از چنین شیری جهت تهیه پنیر با توجه به حرارت نامناسب که به این شیرها جهت تهیه پنیر داده می‌شود می‌توانند سبب آلودگی محصول گردند [۱۹]. نتایج مطالعه ما بر روی اشریشیاکلای و کلیفرم در پنیر سنتی بسیار نزدیک به مطالعات دهه گذشته بوده است. تفاوت کمی که در میزان درصد فراوانی کلیفرم و اشریشیاکلای در پنیرهای سنتی محتلف مشاهده می شود به دلیل، گوناگونی در تکنولوژی تولید و بهداشت تهیه‌کنندگان این فرآورده می‌باشد. حضور اشریشیاکلی در نمونه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر می‌تواند ناشی از درصد کم نمک پنیر در نمونه‌ها و مقاومت اشریشیاکلی به شرایط اسیدی پنیر دانست.

سویه‌های اشرشیاکلی مولد شیگاتوکسین یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خطرناک که حتی می تواند باعث مرگ و میر بالا در اپیدمی‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده گردد [۵]. سویه هایی از این باکتری ژن های: Stx (ژن شیگا توکسین)، A eae (ژن پروتئین غشایی) و ehlyA (ژن

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]

همولیزین) را به عنوان عوامل حدت حمل می‌کنند. به علت این‌که شناسایی این سویه‌ها به صورت معمول در آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌گیرد، لزوم کاربرد یک روش دقیق ملکولی مانند PCR جهت شناسایی و بررسی این باکتری‌های مهم کلینیکی مشخص می شود. با توجه به اهمیت این گروه از بیماری‌زاها، بخش بعدی این مطالعه نیز با هدف تعیین میزان شیوع ژن‌های حدت Stx1، Stx2، eaeA و ehlyA در جدایه‌های اشریشیاکلای پنیر خیکی با استفاده از آزمون PCR انجام شد. که در این مطالعه بیش‌ترین فراوانی مربوط به ژن‌های Stx2 با ۸۹٪/۹ و Stx1 با ۷۲/۸٪ می‌باشد.

مطالعات فراوانی در خصوص ردیابی سویه های اشریشیاکلای بیماری‌زا و بررسی ژن‌های حدت آن‌ها در فرآورده های دامی، در مناطق مختلف جهان صورت گرفته است.

در مطالعه بنیادیان و همکاران در سال ۱۳۹۰ که بر روی ۱۴ جدایه اشریشیاکلای پنیرهای غیرپاستوریزه صورت گرفت هیچ ژن حدتی در جدایه‌ها یافت نشد. اما در مورد ۳۹ جدایه شیر خام ۷/۸۹٪ جدایه‌ها دارای ژن Stx2 و ۵/۲۶ دارای ژن eae بودند [۴].

در مطالعه ژن‌های حدت که در شهر مراغه بر روی ۳۲ جدایه اشریشیاکلای پنیرهای سنتی لیقوان انجام شد، تنها ۱۵٪/۵۶ جدایه‌ها دارای ژن eae بودند و هیچ ژن Stx یافت نشد [۲۲].

در بررسی که توسط Elhadidy و Mohammed در سال ۲۰۱۲ روی ۱۴ جدایه اشریشیاکلای جدا سازی شده از پنیر تولید شده از شیر خام در مصر انجام گرفت، ژن Stx2 با ۱۰۰٪ فراوانی در بین جدایه‌ها و ترکیب ژنی Stx2 - Stx1 با ۵۰٪ فراوانی بیش‌ترین رخداد را داشتند که با نتایج ما مطابقت داشت [۶].

در بررسی ژنی که بر روی اشریشیاکلای جداشده از گوشت گوسفندی در استان چهارمحال و بختیاری توسط مهرابیان و همکاران در سال ۱۳۹۲ صورت گرفت، از بین ژن‌های حدت Stx1 با ۱۱/۱٪ بیش‌ترین فراوانی را داشت و Stx2 در هیچ نمونه‌ای یافت نشد [۲۱].

در مطالعه‌ای که در شهر اصفهان توسط صفرپور دهکردی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به منظور بررسی اشریشیاکلای جداشده از پنیر گوسفندی انجام شد، نتیجه دیگری حاصل شد و مشخص شد که eaeA با ۱۳/۰۴٪ بیش‌ترین فراوانی را دارد [۱۵].

صفرپور دهکردی و همکاران در سال ۱۳۹۳ که نیز بر روی اشریشیاکلای پنیر گوسفندی اصفهان بررسی انجام دادند، اذعان داشتند بیش‌ترین ترکیب ژنی متعلق به Stx2 - Stx1 با میزان فراوانی ۸/۷٪ بود [۱۵].

تفاوتی که در میزان فراوانی ژن های حدت در تحقیق مختلف وجود دارد، می‌تواند به محل جغرافیایی، روش‌های شناسایی و جداسازی باکتری، تنوع میزبان‌ها و حتی فصول سال نیز ارتباط داشته باشد [۲۳].

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که، تقریباً ۶۰٪ پنیرهای سنتی سمنان که آلوده به اشریشیاکلای می‌باشند، غیر قابل مصرف انسانی و تهدیدی برای سلامت جامعه محسوب می‌شوند. به منظور بررسی شیوع ژن های حدت در اشریشیاکلای‌های جداسازی شده از پنیر، با توجه به دوز عفونی پایین باکتری و عوارض وخیمی چون HUS و کولیت هموراژیک و عدم شناسایی این سویه با روش‌های مرسوم در آزمایشگاه‌های کشور، از Multiplex PCR به عنوان یک روش سریع و با حساسیت و ویژگی بالا که قابلیت تشخیص ژن‌های حدت به صورت کمپلکس در جدایه‌ها را دارا می‌باشد، استفاده شد. که شاهد شیوع ۹۳٪ فاکتورهای حدت در جدایه‌ها بودیم. و در آخر با توجه به شیوع بالای ژن‌های حدت در سویه‌های اشریشیاکلای بیماری‌زا در فراورده‌های خام لبنی، به کارگیری روش‌های مولکولی به منظور بررسی کنترل کیفیت میکروبی این محصولات ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین با توجه به امکان آلودگی انواع فرآورده‌های دامی به اشریشیاکلای‌های بیماری‌زا و تنوع ژنتیکی این باکتری‌ها، ارزیابی ژن‌های بیماری‌زا و مقایسه ژنوتایپینگ سویه‌های جدا شده از مواد غذایی با نمونه‌های کلینیکی در مناطق مختلف کشور توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان مربوط به طرح پایان‌نامه دانشجویی به شماره ثبت ۶۵ نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

منابع

[1] Fox PF, Guinee TP, Cogan T, McSweeney PL. Fundamentals of cheese Science. New York 2017.

[2] Parsaeimehr M, Khazaei M, Jebellijavan A, Staji H. Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria by sequencing the 16s rRNA from Semnan traditional cheese (Khiki). J Human Environ Health Prom 2019; 5: 15-20.

[3] Shekarforoush S, Karim G, Razavi Rohani SM, Kiaie M, Rokni N, Abbasvali M. Study on the overview on foodborne bacteria in foodstuffs with animal origin in Iran; Part one: milk and dairy products. J Food Hygiene 2012; 2.

[4] Bonyadian M, Zahraei Salehi T, Mahzounie MR, Akhavan Taheri F. Virulence genes of verotoxigenic E. coli isolated from raw milk and unpasturized. J Vet Res 2011; 66: 223-228.

[5] Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E. Verocytotoxin-producing escherichia coli O157 in

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]

minced beef and dairy products in Italy. Int J Food Microbiol 2004; 96: 67-73.

[6] Elhadidy M, Mohammed MA. Shiga toxin producing Escherichia coli from raw milk cheese in Egypt: prevalence, molecular characterization and survival to stress conditions. Lett Appl Microbial 2012; 56: 120-127.

[7] Rey J, Sanchez S, Blanco JE, Hermoso de Mendoza J, Hermoso de Mendoza M, Garcia A, et al. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin producing Escherichia coli isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. Int J Food Microbiol 2006; 107: 212-217.

[8] Solomakos N, Govaris A, Angelidis AS, Pournaras S, Rothi A, Kritas SK, Papageorgiou DK. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of Escherichia coli O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. Food Microbiol 2009; 26: 865-871.

[9] Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Cerf O. Review of Shigatoxin producing Escherichia coli (STEC) and their signi fi cance in dairy production. Int J Food Microbiol 2013; 162: 190-212.

[10] Baylis CL. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin producing Escherichia coli. Int J Dairy Technol 2009; 62: 293-307.

[11] Hamid S, Salimi Bejestani MR, Changizi E, Javaheri Vayeghan A. Distribution of Escherichia coli Shiga toxin encoding genes (stx1, stx2) in Sangesari lambs suffering from diarrhea by Multiplex PCR technique. Koomesh 2015; 17: 84-91. (Persian).

[12] Osmundson T, Eyre C, Hayden K. An evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. Mol Ecol Resour 2013; 13: 66-74.

[13] Staji H, Rassouli M, Jourablou S. Comparative virulotyping and phylogenomics of Escherichia coli isolates from urine samples of men and women suffering urinary tract infections. Iranian J Basic Med Sci 2019; 22.

[14] Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic escherichia coli by multiplex PCR for stx1, stx 2, eae, ehxA, and saa. J Clin Microbiol 2002; 40: 271-274.

[15] Safarpoor Dehkordi F, Rahimi E, Ghobadi M, Yahaghi E. Shiga-toxigenic Escherichia oli in sheep cheeses. Iran J Infect Dis 2014; 19: 25-29. (Persian).

[16] Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing Escherichia coli in Swiss Raw milk cheeses collected at producer level. J Dairy Sci 2008; 91: 2561-2565.

[17] Rezaei M, Yahyaei M, Parviz M, Khodaei motlagh M. A Survey of microbial contamination in traditional cheese distributed in Markazi province in 2010. J Health Environ 2014; 7: 115-122. (Persian).

[18] Vaziri S, Naghshbandi N. Investigating contamination of traditional non-pasteurized cheeses with Enterobacteriaceae in Maragheh. Iran J Med Microbial 2012; 5: 23-28. (Persian).

[19] Shadan MR. Investigation of Salmonella Spp, E. coli, listeria monocytogenese, and coagulase positive Staphylococcus in traditional cheese of retail shops in Zahedan. J Res Med Sci 2003; 4: 31-39. (Persian).

[20] Parsaeimehr M, Jebellijavan A, Azizkhani M, Keykhosravi K, Mahdavi A, Khazaei M. Microbiological and chemichal evaluation of traditional Semnan province khiki cheeses. Appl Animal Sci Res J 2015; 15: 57-64. (Persian).

[21] Mehrabiyan S, Tahmasby H, Momtaz H, Khosravi N, Kaboli Boroujeni H, Najafzadeh V, et al. Multiplex PCR detection of stx1, stx2 and eaeA genes in Escherichia coli isolated from lambs in Chaharmahal va Bakhtiari, Iran. Biol J Mic 2013; 6: 8-11. (Persian).

[22] Mahdavi S. Study of frequency of eaeA, stx1 and stx2 genes in Escherichia coli isolated from local cheeses in Maragheh city by multiplex PCR. Iran Food Sci Technol Res J 2016; 12: 388-393.

[23] Sarimehmetoglu B, Aksoy MH, Ayaz ND, Aya, Y, Kuplulu O, Kaplan YZ. Detection of Escherichia coli O157 H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. Food Cont 2009; 20: 357-361.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]

Volume 23, Issue 1 (Winter 2021), 174-179

Molecular investigation of the prevalence and detection of enterohemorrhagic Escherichia coli isolated from traditional cheese in Iran

Maryam malekiparvari (M.Sc) [1], Mahnoosh Parsaeimehr (Ph.D)[*1], Hamid Staji (Ph.D)[2], Ashkan Jebellijavan (Ph.D)[1]
1- Food Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran
2- Dept. of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 23-31532626 mparsaei@semnan.ac.ir
Received: 5 Feb 2020; Accepted: 13 Jun 2020

Introduction: Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains are one of the main causes of food poisoning and diseases such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Food contamination mainly occurs through food of animal origin such as meat and dairy products. The aim of this study was to investigate prevalence and distribution of virulence genes in Escherichia coli isolates from traditional cheese from Semnan city, using multiplex PCR method.

Materials and Methods: In this study, a total of 100 traditional cheese samples were screened for E. coli strains through conventional microbiological tests. Then, screening for virulence genes (Stx1, Stx2, eaeA and hlyA genes) was carried out by using PCR method.

Results: Fifty-nine Escherichia coli strains were identified among 100 cheese samples. Of these, 55 isolates exhibited for one or more virulence genes (93.2%) which, 44 isolates carrying more than of one gene and 11 isolates were positive for the carrier of one gene. Stx2 showed the highest frequency of virulence gene in E. coli isolates.

Conclusion: Therefore, due to the high prevalence of virulence genes in pathogenic E. coli isolates in traditional cheese, it is necessary to use molecular methods to control the microbial quality of these products.

Keywords: Shiga-Toxigenic Escherichia Coli, Virulence Factor, Cheese, Multiplex Polymerase Chain Reaction.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.174]